

ساخت پلاسمید نو ترکیب جدید حامل دو ژن خودکشی سلولی HSV-tk و Yeast-cd به منظور دستکاری ژنتیکی لیشمانیا

عباس دوستی^{۱*}، دکتر نوشین داودی^{۲*}، دکتر فریدون مهبودی^{۳*}

^{۱*} دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی - مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ^{۲*} استادیار مرکز

تحقیقات بیوتکنولوژی - انستیتو پاستور ایران، ^{۳*} دانشیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی - انستیتو پاستور ایران.

تاریخ دریافت: ۱۵/۹/۲۸ تاریخ تأیید: ۱۶/۲/۲۶

چکیده:

زمینه و هدف: لیشمانیوز به گروهی از بیماریهای انگلی ناشی از گونه های مختلف لیشمانیا اطلاق می شود که اشکال بالینی گوناگونی دارد. این انگل در انسان و حدود ۱۰۰ گونه حیوان ایجاد بیماری می نماید و در بخش های وسیعی از جهان و از جمله ایران شایع است. یکی از زمینه های دستیابی به واکسنی مؤثر علیه لیشمانیا، دستکاری ژنتیکی این تک یاخته و استفاده از انگل مهندسی شده به عنوان واکسن می باشد. هدف از این تحقیق طراحی و ساخت کاست ژنی جدیدی است که به منظور وارد ساختن ژنهای خودکشی سلولی شامل HSV-tk و Yeast-cd به ژنوم لیشمانیا طراحی گردیده است.

روش بررسی: در یک مطالعه آزمایشگاهی ابتدا دو قطعه ژن تیمیدین کیناز ویروس هرپس سیمپلکس (HSV-tk) و سیتوزین دامیناز مخمر ساکارومایسس سرویزیه (Yeast-cd) به همراه ژن آلفا توبولین لیشمانیا (atub) با ترتیب tk-atub-cd در پلاسمید pBluscript کلون شدند. سپس مجموعه ژنی مذکور از پلاسمید pBluscript خارج گردیده و در پلاسمید pF4X1.4sat کلون گردید و به منظور تأیید کانستراکت نهایی از هضم برش توسط آنزیم های محدود الاثر استفاده شد.

یافته ها: قطعات ژنی tk-atub-cd با موفقیت در پلاسمید pBluscript کلون گردیده و صحت کلونینگ مورد تأیید قرار گرفت. سپس این مجموعه ژنی در پلاسمید pF4X1.4sat درج شد و صحت حضور و ترتیب قرارگیری این ژنها اثبات گردید.

نتیجه گیری: سیستم طراحی شده در این تحقیق می تواند دو ژن خودکشی سلولی را به درون ژنوم لیشمانیا منتقل کند و در تحقیقات آینده در زمینه دستیابی به واکسن زنده علیه لیشمانیا مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: پلاسمید، ژن تیمیدین کیناز، ژن سیتوزین دامیناز، کلونینگ، لیشمانیا.

مقدمه:

میلیون نفر نیز به این بیماری مبتلا هستند (۳،۲). از آنجا که کشور ما دارای شرایط آب و هوایی مناسب برای رشد و تکثیر ناقلین و مخازن این بیماری است، لذا این بیماری از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۴،۳).

انتقال ژنهایی که در بر دارنده فنوتیپ مقاومت و یا حساسیت به عوامل دارویی مختلف می شوند و یا سبب انتخاب مثبت یا منفی می گردند، در حال حاضر

لیشمانیوز یک بیماری انگلی است که گسترش جهانی دارد و عامل آن تک یاخته ای از جنس لیشمانیاست (۱). این بیماری دارای اشکال گوناگونی شامل لیشمانیوز جلدی، لیشمانیوز جلدی - مخاطی و لیشمانیوز احشایی است. ۳۵۰ میلیون نفر در سراسر دنیا در معرض ابتلا به لیشمانیوز می باشند و سالانه چهارصد هزار مورد جدید گزارش می گردد و در حدود ۱۲

شده و مقاومت بالایی علیه لیشمانیا پدید آورده است (۹). هدف از این تحقیق، طراحی و ساخت یک کاست ژنی جهت انتقال و ادغام ژن های سیستم خودکشی سلولی (tk و cd) در ژنوم لیشمانیا می باشد.

روش بررسی:

برای انجام این تحقیق از مواد و وسایل زیر استفاده شد: ژنهای مورد نیاز برای انجام این مطالعه، به همراه حاملین آنها از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران گرفته شدند. به این صورت که ژن cd به همراه حامل آن، یعنی پلاسمید pGEM به صورت سازه pGEM(cd) و ژنهای tk و atub با پلاسمید pBluscript به شکل tk-atub) pBluscript دریافت شد. آنزیم های برش دهنده مورد نیاز، شامل Xba I، Spe I و Not I و Sal I بوده که همگی از شرکت Fermentas کشور آلمان تهیه گردیدند. آنزیم لیگاز Invitrogen کشور آمریکا بوده و کیت استخراج پلاسمید، از شرکت Core One کشور کره جنوبی خریداری شد. باکتری *E. coli* سویه Top10F، کیت تخلیص DNA از ژل، پودر آگارز، آنزیم Taq polymerase و بافرهای مربوطه از شرکت سیناژن ایران تهیه شد.

روشها: به منظور ساخت کانستراکت مناسب برای وارد سازی ژنهای HSV-tk و Yeast-cd به درون ژنوم لیشمانیا به صورت زیر عمل شد: قطعات ژنی تیمدین کیناز، سیتوزین دامیناز و آلفاتوبولین باید به ترتیب tk-atub-cd در کنار هم قرار گیرند. قطعه ژن cd در پلاسمید pGEM و قطعات ژنی tk-atub در پلاسمید pBluscript قرار داشتند. همانطور که در بالا اشاره شد، این قطعات ژنی به همراه حاملین آنها از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران گرفته شدند و سایر مراحل تحقیق در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه

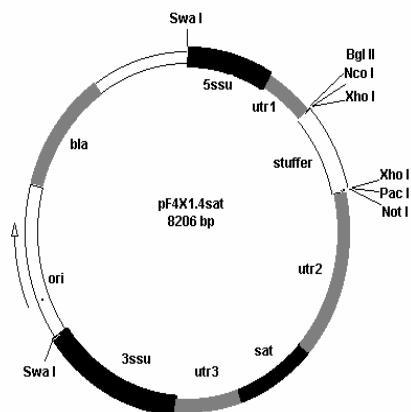
یک تکنیک بسیار مهم در مطالعات ژنتیک مولکولی و بیولوژی سلولی به شمار می آیند. یکی از کاربردهای انتقال ژن، انتقال ژنهای خودکشی سلولی (Suicide genes) است. محصول یک ژن خودکشی سلولی در اغلب مواقع یک آنزیم است. آنزیم هایی مانند تیمیدین کیناز ویروس هرپس، تیمیدین کیناز ویروس واریسلا زوستر و سیتوزین دامیناز مخمر ساکارومایسس سرویزیه از جمله آنزیم های سیستم خودکشی سلولی محسوب می شوند. این آنزیم ها قادرند که پیش داروها (Prodrugs) را به فرم توکسیک تبدیل کنند و این آتابولیت ها از ستر اسیدهای نوکلئیک جلوگیری می کنند. درمان با پیش دارو سبب اثراتی می شود که تنها محدود به سلول های بیان کننده ژن بوده و ایجاد سمیت سیستمیک قابل توجه نمی کند (۵). یکی از اصول استفاده از ژنهای خودکشی سلولی، انتخاب ترکیب آنزیم - پیش دارو می باشد. از جمله ژنهایی که در این راستا به کار گرفته شده اند، ژن تیمیدین کیناز ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک (HSV-1 tk) و سیتوزین دامیناز ساکارومایسس سرویزیه (Yeast-cd) می باشد. این دو ژن به ترتیب در حضور دو داروی گانسیکلوویر و ۵- فلوروسیتوزین، سیستم خودکشی سلولی یا به عبارتی ترکیب آنزیم - پیش دارو را تشکیل می دهند. یعنی محصول ژنهای tk و cd در اثر تغییراتی که روی داروهای گانسیکلوویر و ۵- فلوروسیتوزین می دهند آنها را به مواد سمی مبدل می سازند که برای سلول حامل این ژنها مرگ آور است (۵، ۶). در سال ۱۹۹۰ برای اولین بار ژن tk در پلاسمیدی کلون گردید و وارد سلول لیشمانیا شد که در سالهای بعد از این انگل مهندسی شده جهت واکسیناسیون موشهای balb/c استفاده شد و نتایج حاصل از آن موفقیت آمیز بود (۷، ۸). در مطالعه ای دیگر با استفاده همزمان از دو ژن tk و cd ایجاد لیشمانیای نوترکیبی شده است که در واکسیناسیون موشهای balb/c و C57bl/6 به کار برده

کمک می‌کنند. ژن sat به عنوان مارکر انتخابی مثبت، نقش ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک نورزئوتراپسین را بر عهده دارد. ژن bla در سلولهای ترانسفکت شده با این پلاسمید، مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین را ایجاد می‌کند. بخش ori نیز محل شروع همانند سازی پلاسمید را تعیین می‌کند. ناحیه Stuffer شامل یک قطعه ۷۰۰ bp می‌باشد که در دو انتهای آن، سایتهای برشی مناسب برای آنزیم های برش دهنده، وجود دارد. ژنهای مورد نظر برای کلونینگ، در این قسمت وارد می‌شوند. در واقع این عمل با خارج ساختن Stuffer و جایگزینی ژنهای مورد نظر، به جای آن صورت می‌گیرد (تصویر شماره ۱).

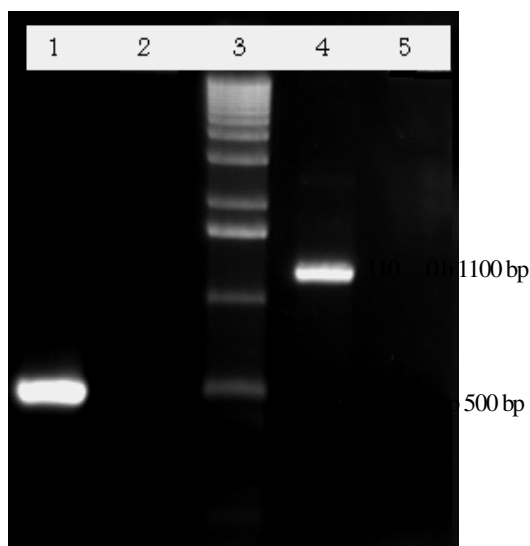
با توجه به اینکه کانستراکت نهایی از قرار دادن قطعات ژنی tk-*atub*-cd در وکتور pF4X1.4sat حاصل می‌شود، ابتدا ساختار پلاسمیدی حاصل از مرحله قبل یعنی کانستراکت pBluscript (tk-*atub*-cd)، تحت اثر آنزیم های برش دهنده Not I و Sal I قرار گرفت و مجموعه ژنی tk-*atub*-cd به صورت یکجا از آن خارج گردید و پلاسمید pF4X1.4sat نیز با آنزیم های برش

آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شد. پلاسمید pGEM حامل ژن cd که با نماد pGEM(cd) نمایش داده می‌شود، به منظور خارج ساختن قطعه ژن cd از آن، تحت تأثیر آنزیم های برش دهنده Spe I و Xba I قرار داده شد و پس از الکتروپورز روی ژل آگارز ۱ درصد، قطعه ژن cd با اندازه ۵۰۰bp از ژل بریده شد و با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل، قطعه ژن مذکور از ژل آگارز تخلیص گردید. از طرف دیگر، پلاسمید pBluscript حامل ژنهای تیمیدین کیناز و آلفا توپولین، که با نماد pBluscript (tk-*atub*) نشان داده می‌شود نیز با آنزیم Xba I بریده شد و به صورت یک مولکول DNA خطی در آمد و مراحل الکتروپورز و خالص سازی از ژل آگارز مطابق آنچه در بالا گفته شد، صورت پذیرفت. بین قطعه ژن cd و مجموعه pBluscript (tk-*atub*) با استفاده از آنزیم لیگاز، عمل Ligation انجام شد و محصول این مرحله در باکتری *E. coli* سویه Top10F، ترانسفرم گردید. بعد از کشت باکتری ترانسفرم شده مذکور و تشکیل کلنی، استخراج پلاسمید با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید انجام شد و صحت تشکیل کانستراکت pBluscript (tk-*atub*-cd) با هضم برشی توسط آنزیم های محدودالانتر، مورد بررسی قرار گرفت (۱۰).

برای ساخت کاست ژنی متناسب با ژنوم لیشمانیا که قادر به انتقال مجموعه ژنی tk-*atub*-cd به محل زیر واحد کوچک ریبوزوم باشد، از وکتور pF4X1.4sat استفاده شد. این وکتور دارای خصوصیات زیر می باشد: بخش های 5ssu و 3ssu که در دو سر هر یک از آنها سایت برشی برای آنزیم Swa I وجود دارد. نواحی 5ssu و 3ssu برای درج ژن در ژنوم لیشمانیا از طریق پدیده Homologous recombination دارای نقش اساسی می باشند. نواحی utr1 و utr2 و utr3 در عمل Post-transcriptional mRNA Processing پس از رونویسی نقش دارند و به



تصویر شماره ۱: تصویر شماتیک وکتور pF4X1.4sat



تصویر شماره ۳: آزمایش PCR برای تأیید حضور تیمیدین کیناز و سیتوزین دامیناز در کانستراکت نهایی pF4X1.4sat (tk- α tub-cd).

۱- انجام PCR برای ژن *cd* که باند ۵۰۰ bp مربوط به این ژن را نشان می‌دهد. ۲- کنترل منفی مربوط به ژن *cd* ۳- مارکر ۱ kb ساخت شرکت Fermentas ۴- نتیجه واکنش PCR برای ژن *tk* که باند ۱۱۰۰ bp مربوطه را دارد. ۵- کنترل منفی مربوط به ژن *tk*

بعد از انجام PCR (Polymerase Chain Reaction) با استفاده پرایمرهای اختصاصی هر یک از ژنهای تیمیدین کیناز، آلفاتوبولین و سیتوزین دامیناز، حضور هر یک از این قطعات در پلاسمید مذکور تأیید گردید (تصویر شماره ۳) و ترتیب صحیح قرار گیری آنها نیز ضمن هضم برشی با آنزیم های محدودالاثرا اثبات شد و کانستراکت نهایی pF4X1.4sat (tk- α tub-cd) بدست آمد.

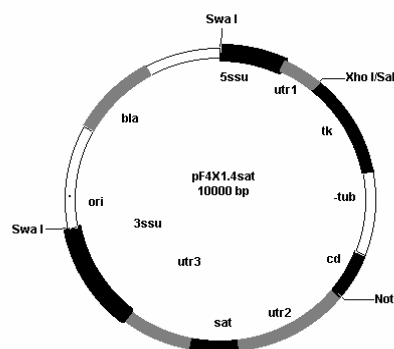
بحث:

این مطالعه وارد سازی ژنهای سیتوزین دامیناز مخمر ساکارومایسس سرویزیه و تیمیدین کیناز ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ را به یک وکتور یوکاریوتی شرح می‌دهد. این طرح اساس پیشرفت سیستم‌های

دهنده Not I و Sal I، بریده شد و پس از انجام الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد و خروج قطعه Stuffer از آن، خالص سازی پلاسمید خطی شده pF4X1.4sat از ژل آگارز مطابق روش ذکر شده در بالا، انجام پذیرفت و بین وکتور مذکور و مجموعه ژنی tk- α tub-cd عمل Ligation با استفاده از آنزیم لیگاز، انجام شد (۱۰). محصول Ligation در باکتری *E. coli* سویه Top10F ترانسفرم گردید و به منظور تأیید کانستراکت نهایی از هضم برشی توسط آنزیم های محدودالاثرا و تکنیک PCR بهره گرفته شد (۱۰).

یافته ها:

قطعات ژنی tk- α tub-cd در پلاسمید pBluscript با ترتیب صحیح در کنار هم قرار گرفتند و پس از کنترل های نهایی و تأیید حضور تک تک این ۳ قطعه ژن و تأیید قرار گرفتن آنها در محل مناسب در کانستراکت (tk- α tub-cd) pBluscript، این مجموعه ژنی به صورت یکجا در پلاسمید pF4X1.4sat کلون گردید (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۲: تصویر شماتیک کانستراکت نهایی pF4X1.4sat (tk- α tub-cd) که سه ژن تیمیدین کیناز، آلفاتوبولین و سیتوزین دامیناز در آن کلون گردیده اند.

ژن آلفاتوبولین لیسمانیا نیز در کنار آنها کلون گردید. برای بیان شدن ژنهای بیگانه در ژنوم لیسمانیا نیاز به ژنهای خودی است که بهترین آنها ژن آلفاتوبولین می باشد. این ژن به صورت چندین کپی و به صورت تکرارهای پشت سر هم (Tandem repeat) در ژنوم لیسمانیا وجود دارد و به میزان بسیار بالایی در سلول لیسمانیا بیان می گردد. ژن آلفاتوبولین روی میزان بیان ژنهای فرادست و فرودست خود اثر افزایشی دارد (۱۴، ۱۳). استفاده از دو ژن خودکشی سلولی در یک وکتور از این مزیت برخوردار است که چنانچه سلول حساسیت خود را نسبت به یکی از دست داد، نسبت به دیگری همچنان حساسیت خواهد داشت (۱۵). با انتقال کاست ژنی ساخته شده در این تحقیق، به درون ژنوم لیسمانیا می توان سوش نوترکیب مناسب بدست آورد که قابلیت کنترل عفونت زایی بواسطه آن آسان است و در آینده می توان از آن در تحقیقات تولید واکسن زنده علیه لیسمانیا استفاده کرد.

نتیجه گیری:

سیستم طراحی شده در این تحقیق می تواند دو ژن خودکشی سلولی را به درون ژنوم لیسمانیا منتقل کند و در تحقیقات آینده در زمینه دستیابی به واکسن زنده علیه لیسمانیا مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از زحمات معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و جناب آقای عادل و کلیه پرسنل مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران که نقش مهمی در به ثمر رسیدن این تحقیق داشته اند صمیمانه تشکر می نمایم.

انتخاب منفی و یا وکتورهای خودکشی سلولی برای دستکاری ژنتیکی انگل لیسمانیا را تشریح می کند. پلاسمید نوترکیب حاصل از این تحقیق، در مقایسه با دیگر پلاسمیدهای بکار رفته در این زمینه دارای مزایای زیادی از جمله توانایی وارد ساختن ژنهای خارجی حمل شده به درون ژنوم لیسمانیا و از طرفی وارد ساختن این ژنها به صورت هدفمند در مکان دلخواه، یعنی در محل ژن زیر واحد کوچک ریپوزوم و مزیت دیگر آن اینکه نه تنها ژنهای حمل شده را وارد مکان خاصی از ژنوم می کند بلکه با توجه به اینکه تعداد نسخه های فراوانی از ژن زیر واحد کوچک ریپوزوم در هر سلول وجود دارد، پس تعداد زیادی از ژنهای خارجی وارد ژنوم لیسمانیا می نماید و محصولات زیاده تری تولید خواهد کرد. برای اولین بار در سال ۱۹۹۰، ژن HSV-tk را در پلاسمیدی کلون کرده و وارد سلول لیسمانیا نمودند. در این روش پلاسمید حامل این ژن به صورت ایی زومال قرار داشت و ژن tk قادر به درج شدن در ژنوم لیسمانیا نبود. در واقع این اولین باری بود که از ژن tk به عنوان یک مارکر انتخابی منفی استفاده می گردید (۱۱). در سال ۱۹۹۸ از انگل لیسمانیای حامل ژن tk در ایجاد واکسیناسیون علیه لیسمانیا بهره گرفته شد و درمان زخم ناشی از انگل با داروی گانسیکلوویر موفقیت آمیز بود (۸). ژن سیتوزین دآمیناز در سال ۱۹۹۲ توسط PCR از باکتری E. coli بدست آمد و به دنبال آن از مخمر جدا شد و در وکتوهای مختلف کلون گردید (۱۲). ژن cd در سال ۱۹۹۸ به عنوان یک مارکر انتخابی منفی در *Toxoplasma gondii* به کار رفت و این انگل به داروی ۵-فلوروسیتوزین حساس شد و این در حالی است که انگل وحشی به طور طبیعی نسبت به داروی ۵-فلوروسیتوزین حساس نمی باشد (۱۱). در این تحقیق علاوه بر کلون سازی ژنهای تیمیدین کیناز و سیتوزین دآمیناز،

منابع:

1. Khan MA, Maruno M, Khaskhely NM, Ramzi ST, Hosokawa A, Uezato H, et al. Inhibition of intracellular proliferation of *Leishmania parasites* in vitro and suppression of skin lesion development in balb/c mice by a novel lipid a analog (ONO-4007). *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Aug; 67(2): 184-90.
2. Ashford RW, Desjeux P, Deraadt P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. *Parasitol Today.* 1992 Mar; 8(3): 104-5.
3. Norsworthy NB, Sun J, Elnaiem D, Lanzaro G, Soong L. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. *Infect Immun.* 2004 Mar; 72(3): 1240-7.
4. Handman E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Apr; 14(2): 229-43.
5. Yazawa K, Fisher WE, Brunicardi FC. Current progress in suicide gene therapy for cancer. *World J Surg.* 2002 Jul; 26(7): 783-9.
6. Martin LA, Lemoine NR. Direct cell killing by suicide genes. *Cancer Metastasis Rev.* 1996 Sep; 15(3): 301-16.
7. LeBowitz JH, Cruz A, Beverley SM. Thymidine kinase as a negative selectable marker in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol.* 1992 Apr; 51(2): 321-5.
8. Muyombwe A, Olivier M, Ouellette M, Papadopoulou B. Selective killing of *Leishmania amastigotes* expressing a thymidine kinase suicide gene. *Exp Parasitol.* 1997 Jan; 85(1): 35-42.
9. Khamesipour A, Rafati S, Davoudi N, Maboudi F, Modabber F. *Leishmaniasis vaccine* candidates for development: a global overview. *Indian J Med Res.* 2006 Mar; 123(3): 423-38.
10. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Pres; 1989. p: 17-22.
11. Fox BA, Belperron AA, Bzik DJ. Stable transformation of *Toxoplasma gondii* based on a pyrimethamine resistant trifunctional dihydrofolate reductase-cytosine deaminase-thymidylate synthase gene that confers sensitivity to 5-fluorocytosine. *Mol Biochem Parasitol.* 1999 Jan; 98(1): 93-103.
12. Danielsen S, Kilstrup M, Barilla K, Jochimsen B, Neuhaard J. Characterization of the *Escherichia coli*. *codBA* operon encoding cytosine permease and cytosine deaminase. *Mol Microbiol.* 1992 May; 6(10): 1335-44.
13. Curotto de Lafaille MA, Laban A, Wirth DF. Gene expression in Leishmania: analysis of essential 5' DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992 Apr; 89(7): 2703-7.
14. Spithill TW, Samaras N. Genomic organization, chromosomal location and transcription of dispersed and repeated tubulin genes in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol.* 1987 May; 24(1): 23-37.
15. Borrelli E, Heyman R, Hsi M, Evans RM. Targeting of an inducible toxic phenotype in animal cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988 Oct; 85(20): 7572-6.